This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

					•
	•				
					. *
			•		
					÷
		•			
		·			
					•
				•	
			•		
			•		
•					
				•	



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

G01N 27/447

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/51977**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

14. Oktober 1999 (14.10.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/02059

(22) Internationales Anmeldedatum:

26. März 1999 (26.03.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 15 400.3

6. April 1998 (06.04.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GAUSS, Christine [DE/DE]; Isaraustrasse 19 A, D-82538 Geretsried (DE). HORN, Martin [DE/DE]; Karolinger Platz 1A, D-14052 Berlin (DE). KALKUM, Markus [DE/DE]; Körtestrasse 19, D-10967 Berlin (DE). EICKHOFF, Holger [DE/DE]; Lützelsteiner Weg 50, D-14195 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; v. Bezold & Sozien, Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR COLLECTING SAMPLES IN POLYMER SUPPORT MATERIALS

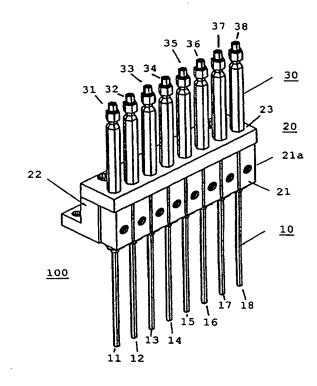
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR PROBENAUFNAHME AUS POLYMEREN TRÄGERMATERIALIEN

(57) Abstract

The invention relates to a device for collecting samples, which comprises a plurality of separation tools (10) (i.e. pipettes) on a support unit (20). Each separation tool (10) is provided with actuating means (30) which is used for controlling said separation tool in an independent manner. When samples are collected (i.e. by pipetting samples from separation gels), the sequentially collected samples are deposited in a parallel way on a target substrate.

(57) Zusammenfassung

Eine Probenaufnahmevorrichtung enthält eine Vielzahl von Trennwerkzeugen (10) (z.B. Stechkapillaren) an einer Halteeinrichtung (20), wobei die Trennwerkzeuge (10) jeweils mit Betätigungsmitteln (30) versehen sind, mit denen die Trennwerkzeuge (10) separat ansteuerbar sind. Probenaufnahmeverfahren (z.B. zum Ausstechen von Proben aus Trenngelen) werden sequentiell aufgenommene Proben parallel auf einem Zielsubstrat abgelegt.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugosławien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 99/51977 PCT/EP99/02059

Vorrichtung und Verfahren zur Probenaufnahme aus polymeren Trägermaterialien

Die Erfindung betrifft eine Probenaufnahmevorrichtung, die zur Aufnahme oder Übertragung einer Vielzahl von Proben aus polymeren Trägermaterialien eingerichtet ist, und ein Verfahren zum Einsatz einer derartigen Probenaufnahmevorrichtung. Die Erfindung betrifft insbesondere die Probenaufnahme durch Abtrennen von Teilbereichen mit bestimmten Substanzen aus Trägermaterialien, wie z.B. das Ausstechen von Substanzbanden aus Trenngelen.

Aus der Chemie, Biologie, Medizin und molekularen Biotechnologie sind allgemein zahlreiche Trennverfahren bekannt, bei denen Substanzgemische in einem Trägermedium substanzspezifisch räumlich getrennt und anschließend weiteren Verarbeitungsschritten unterzogen werden. Im Bereich der Genomforschung werden zur Trennung beispielsweise von Proteingemischen, Genomsequenzen oder DNS-Gemischen, elektrophoretische Trennverfahren mit ein- oder mehrdimensionalen Trenngelen verwendet.

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden beispielsweise Proteine bei einem ersten Trennschritt in einer ersten
Dimension nach ihrem Säure- oder Basencharakter und bei einem
zweiten Trennschritt in einer zweiten Dimension größenabhängig
getrennt. Im Ergebnis befinden sich die getrennten Fragmente
in einem sogenannten zweidimensionalen Gel, das die Form einer
Gelschicht einer Fläche von rd. 8 cm · 12 cm bis 20 cm · 30 cm
und einer Dicke von rd. 0,5 mm bis 1 mm besitzt. Nach der

Trennung werden die Fragmente zur Visualisierung mit organischen (konventionelle Farbstoffe wie z.B. Coomassieblau, Fluoreszenzfarbstoffe) oder anorganischen Substanzen (z.B. Silberfärbung) gefärbt, so daß sich Banden, Flecken oder unregelmäßig geformte Spots bilden. Im folgenden werden die getrennten Fragmente in einem Trägermedium generell als Banden bezeichnet. Die Banden sind in dem zweidimensionalen Gel je nach Substanzeigenschaften unregelmäßig verteilt. Zur weiteren Verarbeitung oder Analyse der getrennten Fragmente wurden bisher die Banden manuell oder halbautomatisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, um dann spezifisch, z.B. mit der Massenspektrometrie, weitere Untersuchungen vorzunehmen.

Bei den genannten Anwendungen in der Genomforschung, aber auch z.B. in der modernen kombinatorischen Chemie, besteht ein Interesse daran, in möglichst kurzen Zeiten eine möglichst große Anzahl von Substanzen zu trennen und die getrennten Fragmente oder Proben weiter zu bearbeiten. Sowohl die Trenntechnik als auch die weitere analytische Untersuchung der Proben lassen heute einen hohen Probendurchsatz zu. Die Übertragung der getrennten Fragmente auf Substrate, die den Ausgangspunkt für die weitere Verarbeitung darstellen, stellt bisher jedoch einen Engpaß dar.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Probenaufnahme anzugeben, die dahingehend verbessert sind, daß eine größere Anzahl von Proben simultan verarbeitet werden kann. Die Erfindung ist insbesondere auf Anwendungen bei gelelektrophoretischen Trennverfahren gerichtet.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung und ein Verfahren mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 10 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht in der Schaffung einer Probenaufnahmevorrichtung mit einer Vielzahl von einzeln betätigbaren Trennwerkzeugen, die gemeinsam in einer Bezugsebene mit Abstand von einem Material, aus dem Proben entnommen werden sollen, verfahrbar sind und selektiv hin zu dem Material bewegt bzw. betätigt werden können. Die Probentrennung aus dem Material erfolgt vorzugsweise seriell. Dies bedeutet, daß die Probenaufnahmevorrichtung immer abwechselnd zu einer bestimmten Position in der Bezugsebene verfahren und dann eines der Trennwerkzeuge zur Probenbeladung betätigt wird. Zum Verfahren in der Bezugsebene ist die Probenaufnahmevorrichtung mit einer Stelleinrichtung versehen. Die Probenübertragung auf ein Zielsubstrat kann dann aus allen Trennwerkzeugen gleichzeitig und parallel erfolgen.

Die Steuerung der Probenaufnahmevorrichtung erfolgt vorzugsweise in Kombination mit einem Bildaufnahmesystem. Das Bildaufnahmesystem enthält eine Kameraeinrichtung, mit der die
Probenpositionen (z.B. Bandenpositionen) erfaßt werden. Aus
den Probenpositionen werden Zielkoordinaten für jede Verfahrbewegung der Stelleinrichtung abgeleitet. Die Kombination einer Probenaufnahmevorrichtung (mit einer Vielzahl von Trennwerkzeugen) mit einem Bildaufnahmesystem stellt ein wesentliches Merkmal der Erfindung dar, da dies eine Automatisierung
und Beschleunigung des gesamten Probenaufnahmevorgangs ermöglicht.

Die Erfindung ist allgemein bei allen Vorgängen anwendbar, bei denen Proben aus einem Träger- oder Probenmaterial entnommen und auf ein Zielsubstrat übertragen werden sollen. Unter Probenaufnahme wird deshalb allgemein das Abtrennen (z.B. Ausschneiden, Stechen, Stanzen oder dgl.) der Probe aus dem Material und das Ablegen der abgetrennten Probe in vorbestimmter Weise auf einem Zielsubstrat verstanden. Die Erfindung läßt

sich besonders gut mit polymeren Trägermaterialien (schichtoder volumenförmig) oder mit anderen Materialien (z.B. Membranen oder auf Substraten angeordneten biologischen Materialien wie z.B. Zellhaufen) anwenden. Das Zielsubstrat ist vorzugsweise eine Mikrotiterplatte. Eine bevorzugte Anwendung der Erfindung besteht in der gesteuerten Entnahme von Proben aus Trenngelen, wobei die Entnahmepositionen durch die Bildverarbeitung in vorbestimmter Weise festgelegt sind und das Anfahren der Entnahmepositionen und die Probenentnahme mit den Trennwerkzeugen (Stechkapillaren) sequentiell erfolgt, und in der Übertragung der entnommenen Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, wobei für die Übertragung eine zeitlich parallele Probenablage in den Vertiefungen vorgesehen ist.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die Figuren beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1 eine Perspektivansicht einer erfindungsgemäßen Probenaufnahmevorrichtung; und
- Fig. 2 eine schematische Übersichtsdarstellung zur Illustration des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf eine Probenaufnahmevorrichtung mit einer Reihe von Trennwerkzeugen beschrieben, die acht kapillarförmige Stechwerkzeuge umfaßt. Die
Erfindung ist jedoch nicht auf diese Ausführungsform beschränkt, sondern mit anders geformten Trennwerkzeugen, mit
matrixartig reihen- und spaltenweise angeordneten Trennwerkzeugen, oder mit einer anwendungsabhängig veränderten Anzahl
der Trennwerkzeuge implementierbar.

Eine erfindungsgemäße Probenaufnahmevorrichtung 100 umfaßt gemäß Fig. 1 eine Vielzahl von Trennwerkzeugen 10, eine Halteeinrichtung 20 und eine Vielzahl von Betätigungsmitteln 30.

Die Trennwerkzeuge 10 umfassen rohrförmige Stech- oder Stanzwerkzeuge z.B. in Form von Stechkapillaren 11 bis 18. Alternativ könnten auch andere Schneidwerkzeuge vorgesehen sein. Jedes Stechwerkzeug ist an einem Ende mit einem Führungsteil 21 der Halteeinrichtung 20 in axialer Richtung verschiebbar verbunden. Am anderen Ende jedes Stechwerkzeugs ist eine Schneide vorgesehen. Die Querschnittsgestalt, die geometrischen Dimensionen und die gegenseitige Anordnung der Stechwerkzeuge werden anwendungsabhängig festgelegt. Für Probenaufnahmen an Trenngelen wird jedes Stechwerkzeug vorzugsweise durch eine Kapillare gebildet, an deren Ende die Schneide durch das Ende der Kapillarwand gegeben ist. Der Innendurchmesser der Kapillare wird anwendungsabhängig ausgewählt und ist vorzugsweise geringer als die Dicke des Materials (Trenngel, Membran oder dgl.), aus dem die Proben entnommen werden sollen. Bei üblichen zweidimensionalen Trenngelen beträgt der Innendurchmesser vorzugsweise rd. 0,5 bis 2 mm, z.B. rd. 1 mm. Die Dicke und das Material der Kapillarwand wird zur Erzielung einer genügenden Widerstandsfähigkeit beim Abtrennvorgang ausgewählt. Die Kapillare kann aus einem inerten Material wie z.B. Metall, Glas, Keramik oder Kunststoff bestehen. Stahlkapillaren werden wegen der hohen Widerstandsfähigkeit bevorzugt. Der gegenseitige Abstand zwischen den Kapillaren wird anwendungsabhängig an die Bedingungen des Zielsubstrats angepaßt. Ist das Zielsubstrat beispielsweise eine Mikrotiterplatte (siehe Fig. 2), so entspricht der Kapillarabstand dem Reservoirabstand der Mikrotiterplatte (z.B. 9 mm).

Die Halteeinrichtung 20 besteht aus den Führungsteilen 21, einer Anschlußplatte 22 und einer Halteplatte 23. Die Anschluß-

platte 22 ist zur Verbindung der Halteeinrichtung 20 mit einer (nicht dargestellten) Stelleinrichtung vorgesehen. Die Stelleinrichtung ist zur Bewegung der Probenaufnahmevorrichtung in eine Bezugsebene zu bestimmten Zielkoordinaten eingerichtet, wie dies unten erläutert wird. Die Halteplatte 23 dient der gemeinsamen Halterung der Führungsteile 21 und der Betätigungsmittel 30 mit der Anschlußplatte 22.

Für jedes Trennwerkzeug (z.B. für jede Kapillare) ist ein Führungsteil 21 vorgesehen, das eine Doppelfunktion besitzt. Erstens wird durch das Führungsteil 21 die axiale Beweglichkeit der Trennwerkzeuge von einer Grundposition in eine Stechposition festgelegt. Außerdem enthält jedes Führungsteil 21 eine Anschlußöffnung 21a, über die das jeweilige Trennwerkzeug von einem Drucksystem (nicht dargestellt) mit einem Druck oder auch mit einem Unterdruck beaufschlagt werden kann. Der Unterdruck dient dem Festhalten der ausgestochenen Probe im Trennwerkzeug. Sollen die Proben auf dem Zielsubstrat abgelegt werden, wird der Unterdruck durch einen geringen Überdruck (jeweils z.B. rund ½ at) ersetzt. Die Anschlußöffnung 21a kann ferner zur Zuführung einer Spülflüssigkeit genutzt werden.

Zur Vermeidung einer Probenwanderung in der Kapillare kann in deren Inneren eine Rückhalteeinrichtung vorgesehen sein, die ein Probenvolumen am Kapillarende von der übrigen Kapillare abgrenzt und z.B. durch einen Stift in der Kapillare gebildet wird.

Die Betätigungsmittel 30 umfassen eine Gruppe von Pneumatikzylindern 31, 32, ..., 38, die jeweils einem Trennwerkzeug zugeordnet sind. Die Pneumatikzylinder sind druckluftbetrieben und
enthalten jeweils elektrische Schaltventile. Wird ein vorbestimmter Pneumatikzylinder durch Betätigung des elektrischen
Schaltventils aktiviert, so wird das zugehörige Trennwerkzeug

in axialer Richtung um einen Vortriebsabstand verschoben. Nach dem Ausstechvorgang erfolgt der Rückzug des Trennwerkzeugs unter Wirkung eines internen Federelements oder einer externen Rückstellfeder oder auch druckbetrieben. Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Trennwerkzeuge oder Ausstechwerkzeuge einzeln ansteuerbar sind und somit die Probenaufnahme an beliebige Probenformate angepaßt werden kann.

Anstelle der Pneumatikzylinder können die Betätigungsmittel 30 andere Antriebseinheiten wie z.B. hydraulische (mit Hydraulikzylinder), piezoelektrische oder elektromagnetische Antriebe enthalten.

Die Halteeinrichtung 20 ist derart mit der Stelleinrichtung verbunden, daß die Richtung der axialen Bewegung der Trennwerkzeuge im wesentlichen senkrecht auf der (Fahr-)Bezugsebene der Stelleinrichtung steht.

Ein Probenaufnahmeverfahren wird im folgenden unter Bezug auf Fig. 2 erläutert. Fig. 2 zeigt schematisch die Probenaufnahmevorrichtung 100 in verschiedenen Verfahrensphasen und die Stelleinrichtung 200, eine Bildaufnahmeeinrichtung 300 und eine Steuereinrichtung 400 am Beispiel der Probenaufnahme aus einem Trenngel 40. Für die Stell- und Steuereinrichtungen können an sich bekannte Anordnungen auf der Grundlage sogenannter "Spotting- und Picking-"Roboter verwendet werden. Die Steuereinrichtung 400 liefert Zielkoordinaten an die Stelleinrichtung 200, an die jeweils die Probenaufnahmevorrichtung 100 gefahren werden soll. Die Zielkoordinaten werden wie folgt mit Hilfe der Bildaufnahmeeinrichtung 300 gewonnen. Als Trenngel 40 ist beispielhaft ein zweidimensionales Gel auf einem ebenen Substrat dargestellt. Alternativ kann die Erfindung entsprechend auch mit eindimensionalen Gelen, z.B. in Schicht- oder Streifenform, implementiert werden.

Die Bildaufnahmeeinrichtung 300 enthält eine Kamera (nicht dargestellt), mit der ein Digitalbild des zweidimensionalen Gels 40 mit den regelmäßig oder unregelmäßig angeordneten, gefärbten Banden 41 erstellt wird. Die Kamera ist vorzugsweise wie die Probenaufnahmevorrichtung mit der Stelleinrichtung verbunden und über dem zweidimensionalen Gel in der Bezugsebene (x-y-Ebene) parallel zur Ebene des Gels 40 verfahrbar. Das Digitalbild wird in der Steuereinrichtung 400 ausgewertet. Die Bildauswertung bezieht sich vorteilhafterweise nicht notwendig auf definierte Markierungen auf dem Trenngelsubstrat, sondern auf die im Trenngel getrennten Banden oder Spots. Mit der Erfindung konnte erstmalig gezeigt werden, daß auch diese Banden oder Spots, die einen variablen Kontrast gegenüber der Umgebung besitzen können, zur Bildaufnahme und -auswertung geeignet sind. Bei größeren Banden oder Spots können sogar mehrere Ausstechvorgänge vorgesehen sein (z.B. Spotdurchmesser 2 mm, Stechkapillarendurchmesser rd. 1 mm: 2 bis 3 Ausstechvorgänge pro Spot). In der Steuereinrichtung ist ein Programmablauf vorgesehen, der in Abhängigkeit von der Bandengröße die Zielkoordinaten bestimmt und festlegt, wie oft benachbarte Gelstücke aus einer Bande entnommen werden sollen. Die Zielkoordinaten beziehen sich auf die Position der Probenaufnahmevorrichtung 100 in Bezug auf eine Bande im zweidimensionalen Gel unter Berücksichtigung der Relativkoordinaten der jeweils anzuwählenden Stechkapillare. Ein wesentlicher Gesichtspunkt der Erfindung besteht darin, daß nach der Bildaufnahme und -verarbeitung bzw. -auswertung eine automatische Probenaufnahme der gewünschten Proben aus dem Trenngel mit den Stechkapillaren in zeitlicher Abfolge durchgeführt wird. Vorteilhafterweise kann die gesamte Bilderkennung automatisiert erfolgen. Eine operatorgesteuerte Kamerakontrolle ist nicht zwingend erforderlich. Die Ausstechpositionen sind entsprechend dem Trennergebnis anwendungsabhängig unregelmäßig und nicht als vorbestimmtes Muster verteilt. Durch den Einsatz der Bildaufnahmeeinrichtung 300, die als optische Positioniereinrichtung benutzt wird, ist auch bei der unregelmäßigen Bandenoder Spotverteilung ein zielgerichtetes Ausstechen möglich.

Mit der Stelleinrichtung 200 ist die Probenaufnahmevorrichtung so angeordnet, daß der Abstand der Stechkapillaren vom Substrat, auf dem sich das Gel befindet, in ihrer Grundposition im wesentlichen gleich dem Vortriebsabstand der Betätigungsmittel (s. oben) entspricht.

Nach Aufnahme des Digitalbildes und Ermittlung der Zielkoordinaten wird die Probenaufnahmevorrichtung 100 zunächst in die erste Position P1 gefahren, an der eine der Stechkapillaren (z.B. 11) in Bezug auf eine bestimmte Bande 42 im Trenngel ausgerichtet ist. Sobald die Position P1 erreicht ist, wird der Pneumatikzylinder 31 betätigt, so daß die Stechkapillare 11 in das Gel geschossen wird und die Probe am Kapillarende aufgenommen wird. Anschließend fährt die Stelleinrichtung 200 die Probenaufnahmevorrichtung 100 zur nächsten Position P2, wo der gleiche Vorgang mit der nächsten Stechkapillare (z.B. 12) wiederholt wird. Die Position P2 kann sich auf eine Probe in derselben Bande 42 oder in einer anderen Bande 43 beziehen. In dieser Weise werden Positionen P1 bis P8 entsprechend der Zahl der Stechkapillaren angefahren (P3 bis P8 nicht dargestellt). Die Stechkapillaren werden somit an den Positionen P1 bis P8 sequentiell beladen. Die sequentiell beladenen Stechkapillaren müssen nicht unbedingt in der Reihenfolge ihrer Anordnung beladen werden.

Anschließend wird, wenn alle oder anwendungsabhängig einige Stechkapillaren beladen sind, die Probenaufnahmevorrichtung zu einem Zielsubstrat z.B. in Form einer Mikrotiterplatte 50 gefahren. Die Probenaufnahmevorrichtung 100 wird so positioniert, daß die Enden der Stechkapillaren jeweils den Reservoiren der Mikrotiterplatte 50 gegenüberliegen. Durch Druckbeaufschlagung der Stechkapillaren werden die einzelnen Proben in

den Reservoiren abgelegt. Die Ablage der Proben auf der Mikrotiterplatte 50 erfolgt für alle Stechkapillaren gleichzeitig bzw. parallel. Die Ablage der Proben ist vorteilhafterweise probenspezifisch. Dies bedeutet, daß jede einzelne Probe oder Gruppen von Proben, die einer gemeinsamen Bande entsprechen, in einzelnen Reservoiren separat abgelegt werden. Die Proben werden in ein geordnetes Raster übertragen, an dem die weitere Auswertung bzw. Analyse erfolgt. Anschließend erfolgt gegebenenfalls unter Zwischenschaltung eines Reinigungsschritts an einem Reinigungsbad 60 die nächste Sequenz der Probenaufnahme am Probensubstrat 40. Die sequentielle Probenaufnahme an den Stechkapillaren und parallele Probenablage wird so oft wiederholt, bis alle Banden aus dem Trenngel ausgestochen sind.

Das in den Figuren 1 und 2 gezeigte System kann dahingehend modifiziert werden, daß nicht eine gerade Reihe von Trennwerkzeugen, sondern gekrümmte Reihe oder eine Matrixanordnung von Trennwerkzeugen bereitgestellt wird. Außerdem kann vorgesehen sein, daß während einer Probeaufnahmesequenz von einer Stechkapillare mehrere Probenstücke in Folge aufgenommen werden. Es ist sogar bei entsprechend angepaßter Probenablage möglich, daß in einer Stechkapillare mehrere Proben von verschiedenen Banden aufgenommen werden. Bei Mehrfachbeladung von Stechkapillaren kann vorgesehen sein, zwischen den Proben Trennstücke z.B. aus einem Gelbereich ohne Probe aufzunehmen. Schließlich können an einer Position (P1, P2, ...) ggf. mehrere Stechkapillaren gleichzeitig betätigt werden.

Das erfindungsgemäße Probenaufnahmesystem besitzt den Vorteil, daß Ausstechgeschwindigkeiten an Trenngelen von rd. 1000 Proben pro Stunde erzielt werden können. Damit werden herkömmliche Ausstechgeschwindigkeiten mit manuellen oder halbautomatischen Stechvorrichtungen von rd. 200 Proben pro Stunde weit überschritten. Die Probenaufnahme kann automatisiert werden. Die hohe Ausstechgeschwindigkeit besitzt den zusätzlichen

11

WO 99/51977

PCT/EP99/02059

Vorteil, daß das Ausstechen z.B. auf einem zweidimensionalen Trenngel mit mehr als 1000 Proteinen beendet werden kann, bevor sich das Trenngel gegebenenfalls zeitabhängig geometrisch verändert und somit eine weitere, reproduzierbare Bearbeitung ausschließt.

PATENTANSPRÜCHE

- 1. Probenaufnahmevorrichtung mit einer Vielzahl von Trennwerkzeugen (10) an einer Halteeinrichtung (20), wobei die Trennwerkzeuge (10) jeweils mit Betätigungsmitteln (30) versehen sind, mit denen die Trennwerkzeuge (10) separat ansteuerbar sind.
- 2. Probenaufnahmevorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der die Trennwerkzeuge rohrförmige Stechwerkzeuge (11 bis 18) sind, die an einem Ende axial verschiebbar an dem jeweiligen Betätigungsmittel (31 bis 38) angebracht sind und am anderen Ende eine Stechschneide besitzen.
- 3. Probenaufnahmevorrichtung gemäß Anspruch 2, bei der die Stechwerkzeuge (11 bis 18) kapillarförmig ausgebildet sind.
- 4. Probenaufnahmevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Betätigungsmittel (30) Pneumatik- oder Hydraulikzylinder (31 bis 38) oder piezoelektrische oder elektromagnetische Auslöseeinrichtungen sind.
- 5. Probenaufnahmevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Trennwerkzeuge (10) reihenförmig oder matrixartig an der Halteeinrichtung (20) angebracht sind.
- 6. Probenaufnahmevorrichtung gemäß Anspruch 5, bei der die Trennwerkzeuge (10) so angeordnet sind, daß deren Enden eine Anordnung besitzen, die der Anordnung von Probenreservoiren in einem bestimmten Mikrotiterplattenformat entspricht.

- 7. Probenaufnahmevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der jedes Trennwerkzeug (10) über ein Führungsteil (21) mit dem jeweiligen Betätigungsmittel (30) verbunden ist, wobei jedes Führungsteil (21) eine Anschlußöffnung (21a) aufweist, über die das Trennwerkzeug mit einem Drucksystem verbunden ist.
- 8. Probenaufnahmevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Halteeinrichtung (20) mit einer Stelleinrichtung (200) verbunden ist, mit der die Halteeinrichtung (20) mit den Trennwerkzeugen (10) in einer x-y-Bezugsebene positioniert ist.
- 9. Probenaufnahmevorrichtung gemäß Anspruch 8, bei der eine Bildaufnahmeeinrichtung (300) und eine Steuereinrichtung (400) vorgesehen sind, wobei die Bildaufnahmeeinrichtung (300) Bilddaten eines Trägermaterials, aus dem Proben entnommen werden sollen, an die Steuereinrichtung liefert, die dazu eingerichtet ist, Zielkoordinaten zur Ansteuerung der Stelleinrichtung (200) zu erstellen.
- 10. Verfahren zur Probenaufnahme, bei dem aus einem Trägermaterial (40) Proben ausgeschnitten und auf ein Zielsubstrat (50) übertragen werden, wobei das Ausschneiden der Proben unter Verwendung einer Probenaufnahmevorrichtung (100) mit einer Vielzahl von Trennwerkzeugen (10) zeitlich sequentiell und die Übertragung der entnommenen Proben auf das Zielsubstrat (50) zeitlich parallel erfolgt.
- 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, bei dem die Probenaufnahmevorrichtung (100) mit einer Stelleinrichtung (200) abwechselnd
 erst in eine bestimmten Zielkoordinaten entsprechende Position
 (P1, P2, ...) gefahren und dann eines oder mehrere der Trennwerkzeuge (31 bis 38) betätigt werden, bis alle oder einige
 Trennwerkzeuge (31 bis 38) mit entnommenen Proben beladen

sind, woraufhin die Probenaufnahmevorrichtung (100) zum Zielsubstrat (50) gefahren wird und die Proben aus den Trennwerkzeugen auf das Zielsubstrat (50) übertragen werden.

- 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem die Zielkoordinaten der Positionen (P1, P2, ...) aus Bildaten des Trägermaterials (40) gewonnen werden.
- 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, bei dem die Trennwerkzeuge (30) mit Druckluft oder einer Druckflüssigkeit betätigt werden.
- 14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, bei dem das Trägermaterial ein Trenngel und die Proben im Trenngel verteilte Substanzbanden (41, 42, 43) sind, die auf eine Mikrotiterplatte (50) als Zielsubstrat übertragen werden.
- 15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 14, bei dem die Trennwerkzeuge (30) mit den entnommenen Proben mit einem Unterdruck bzw. zur Übertragung auf das Zielsubstrat mit einem Überdruck beaufschlagt werden.

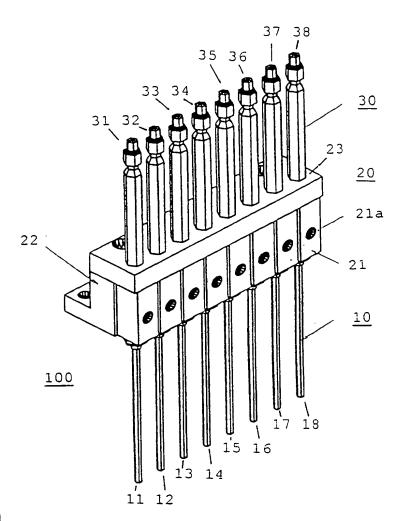
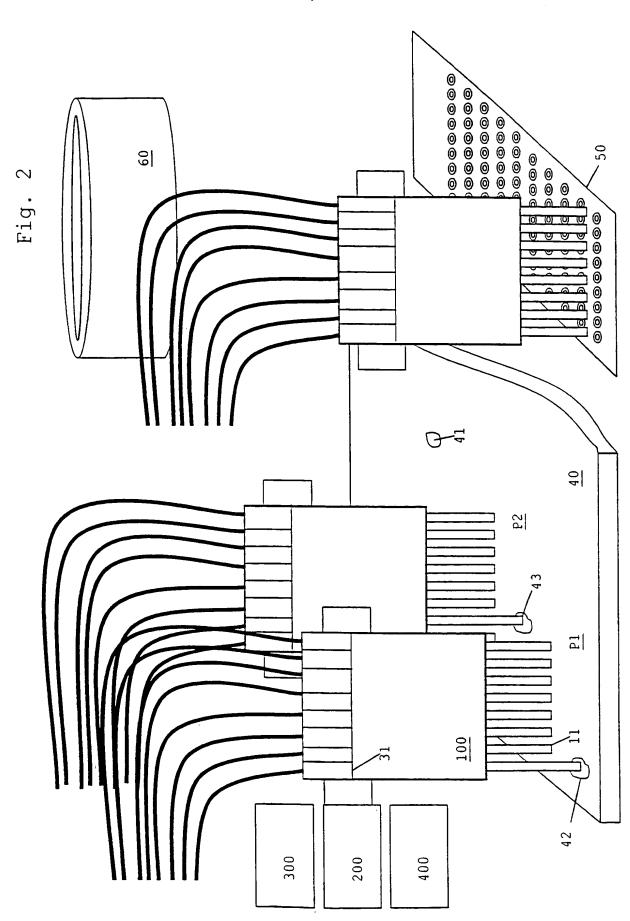


Fig. 1



. Frnational Application No PCT/EP 99/02059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Υ	US 5 587 062 A (TOGAWA Y ET AL) 24 December 1996 (1996-12-24) column 2, line 20 - column 3, line 60; figures 1-4	1-15
Y	EP 0 810 438 A (PACKARD INSTRUMENT COMPANY) 3 December 1997 (1997-12-03) column 5, line 38 - column 13, line 18; figures 1,3,5,7	1-15
Α	WO 94 08234 A (LABINTELLIGENCE) 14 April 1994 (1994-04-14) page 5, line 33 - page 6, line 33 page 7, line 37 - page 9, line 12 figures 1A,1B	1-3,5,6, 10,14

Further documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in annex.
The special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filling date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 1999	29/07/1999
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Johnson, K



ernational Application No. PCT/EP 99/02059

Cato	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PCT/EP 99/02059
Category ³	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Α	GB 2 067 126 A (L'OREAL) 22 July 1981 (1981-07-22) page 1, line 40 - page 3, line 122; figures 1,2,6	1,2,4,5, 7,10-14
Ε	WO 99 30168 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 17 June 1999 (1999-06-17) page 9, paragraph 2 - page 11, paragraph 2; figure 1	1,4-8
	tinuation of second sheet) (July 1992)	



Information on patent family members

rnational Application No PCT/EP 99/02059

Patent document cited in search repor	t	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5587062	Α	24-12-1996	NONE	<u></u>
EP 0810438	Α	03-12-1997	JP 10114394 A AU 6963798 A WO 9845205 A	06-05-1998 30-10-1998 15-10-1998
WO 9408234	Α	14-04-1994	US 5217591 A EP 0614528 A	08-06-1993 14-09-1994
GB 2067126	Α	22-07-1981	FR 2473547 A DE 3100940 A US 4354406 A	17-07-1981 24-12-1981 19-10-1982
WO 9930168	Α	17-06-1999	DE 19754000 A	17-06-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

..ernationales Aktenzeichen PCT/EP 99/02059

A. KLASSII IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N27/447		
Nach der int	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	sifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol G01N	e) .	
			:
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	veit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verwendete S	Suchbegriffe)
	•		
[
	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie'	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Υ	US 5 587 062 A (TOGAWA Y ET AL)		1-15
'	24. Dezember 1996 (1996-12-24)		
	Spalte 2, Zeile 20 - Spalte 3, Z Abbildungen 1-4	eile 60;	
Y	EP 0 810 438 A (PACKARD INSTRUMEN COMPANY) 3. Dezember 1997 (1997-1		1-15
	Spalte 5, Zeile 38 - Spalte 13,		
	Abbildungen 1,3,5,7		
Α	WO 94 08234 A (LABINTELLIGENCE)		1-3,5,6,
	14. April 1994 (1994-04-14)	1. 22	10,14
	Seite 5, Zeile 33 - Seite 6, Zei Seite 7, Zeile 37 - Seite 9, Zei		
	Abbildungen 1A,1B		
		/	
V Wall	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	X Siehe Anhang Patentfamilie	
entr	nehmen		international on Annotated at the
"A" Veröfte	e Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den alligemeinen Stand der Technik definiert, encht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu	worden ist und mit der zum Verständnis des der
"E" älteres	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen	Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist	oder der ihr zugrundeliegenden
"L" Veröffe	intlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlic erfinderischer Tätigkeit beruhend betra	thung nicht als neu oder auf
ander	ter i constanti dei dari die das Veronierinstrungsbaden i einen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann nicht als auf erfinderischer Tätigk	tung; die beanspruchte Erfindung
"O" Veroffe	oführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in	einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und
"P" Veröffe	Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen. Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben	
-	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
,	0. Juli 1999	29/07/1999	
	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 Nt 2280 HV Rijswijk	Se toming any se	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Johnson, K	



PCT/EP 99/02059

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung sowielt der die		
	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommen	den Teile Betr. Anspruch Nr.	
А	GB 2 067 126 A (L'OREAL) 22. Juli 1981 (1981-07-22) Seite 1, Zeile 40 - Seite 3, Zeile 122; Abbildungen 1,2,6	1,2,4,5 7,10-14	,
Ε	WO 99 30168 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 17. Juni 1999 (1999-06-17) Seite 9, Absatz 2 - Seite 11, Absatz 2; Abbildung 1	1,4-8	
	(Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)		

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

.ernationales Aktenzeichen PCT/EP 99/02059

Im Recherchenberich angeführtes Patentdoku		Datum der Veröffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5587062	Α	24-12-1996	KEIN	IE	
EP 0810438	Α	03-12-1997	JP AU WO	10114394 A 6963798 A 9845205 A	06-05-1998 30-10-1998 15-10-1998
WO 9408234	Α	14-04-1994	US EP	5217591 A 0614528 A	08-06-1993 14-09-1994
GB 2067126	Α	22-07-1981	FR DE US	2473547 A 3100940 A 4354406 A	17-07-1981 24-12-1981 19-10-1982
WO 9930168	Α	17-06-1999	DE	19754000 A	17-06-1999

.